

9/720513
PCT/FR 99/01539

5

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

COPIE OFFICIELLE

**PRIORITY
DOCUMENT**SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **30 JUIN 1999**Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIETE
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

| DATE DE REMISE DES PIÈCES 26 JUIN 1998 N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL DÉPARTEMENT DE DÉPÔT L 98 08353 - DATE DE DÉPÔT 26 JUIN 1998 | | 1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE Cabinet LAVOIX 2, place d'Estienne d'Orves 75441 PARIS Cedex 09 | | | | | | | | | |
|--|--------|--|----------------------|----------------|--------|---------------|----------------------|--|--|--|--|
| 2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle <input checked="" type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> demande divisionnaire <input type="checkbox"/> certificat d'utilité <input type="checkbox"/> transformation d'une demande de brevet européen <input type="checkbox"/> demande initiale <input type="checkbox"/> brevet d'invention <input type="checkbox"/> certificat d'utilité n° Établissement du rapport de recherche <input type="checkbox"/> différé <input checked="" type="checkbox"/> immédiat Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance <input type="checkbox"/> oui <input type="checkbox"/> non Titre de l'invention (200 caractères maximum) | | n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone AC/DL BFF98/0275 01 53 20 14 20 date | | | | | | | | | |
| Immunisation à ciblage recto-génito-urinaire par injection dans la cuisse | | | | | | | | | | | |
| 3 DEMANDEUR (S) n° SIREN Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination PASTEUR MERIEUX Sérums & Vaccins | | code APE-NAF Forme juridique | | | | | | | | | |
| Nationalité (s) Française Adresse (s) complète (s) 58 Avenue Leclerc 69348 LYON CEDEX 07 | | Pays FRANCE | | | | | | | | | |
| 4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs <input type="checkbox"/> oui <input checked="" type="checkbox"/> non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée | | | | | | | | | | | |
| 5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES <input type="checkbox"/> requise pour la 1ère fois <input type="checkbox"/> requise antérieurement au dépôt : joindre copie de la décision d'admission | | | | | | | | | | | |
| 6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE <table border="1"> <thead> <tr> <th>pays d'origine</th> <th>numéro</th> <th>date de dépôt</th> <th>nature de la demande</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td> </td> <td> </td> <td> </td> <td> </td> </tr> </tbody> </table> | | | | pays d'origine | numéro | date de dépôt | nature de la demande | | | | |
| pays d'origine | numéro | date de dépôt | nature de la demande | | | | | | | | |
| | | | | | | | | | | | |
| 7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n° date n° date | | | | | | | | | | | |
| 8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (nom et qualité du signataire - n° d'inscription) Cabinet LAVOIX Mandataire Alain COLOMBET CPI N° 95 0306 | | SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION D. GIRAUD | | | | | | | | | |
| SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI | | (Signature) | | | | | | | | | |

La présente invention concerne une méthode d'immunisation permettant d'induire une réponse immunitaire locale dans la région muqueuse recto-génito-urinaire. Elle a également pour objet l'utilisation d'immunogènes pour la réalisation de compositions immunogènes destinées à être administrées selon ladite méthode.

5 La voie de transmission principale du virus du SIDA est constituée par les muqueuses, en particulier muqueuses génitale et rectale, voire muqueuse buccale. Depuis ces muqueuses, le virus dissémine rapidement vers les ganglions drainants, avant de rejoindre le sang périphérique.

10 Comme dans le cas des autres agents pathogènes (virus, bactérie, etc...) à porte d'entrée mucosale, l'induction d'immunité capable de bloquer le virus à son entrée dans la muqueuse ou dans les premières étapes de sa dissémination dans les ganglions paraît importante.

Des travaux sur l'immunisation locale par administration orale, génitale ou rectale ont été menés sans avoir été couronnés de succès.

15 Les travaux de Lehner et al., (Nature Medicine 1996, 2 : 767-775) réalisés chez le macaque rhésus ont montré qu'il est possible d'induire une immunité locale vis-à-vis du virus SIV, en effectuant une injection sous-cutanée profonde dans la région pélvienne au voisinage des ganglions iliaques. Cette immunisation se traduit par l'induction d'anticorps de type IgA et IgG dans les fluides rectal, urinaire et dans
20 le sérum.

Une telle méthode d'immunisation est difficile à mettre en œuvre et en particulier elle n'est pas applicable à l'homme.

25 Il n'existe donc pas à l'heure actuelle de méthode d'immunisation mucosale ciblant la région recto-génito-urinaire, qui soit réellement efficace et utilisable dans la pratique courante de la médecine humaine ou vétérinaire.

La présente invention s'est donc donnée pour objectif de proposer une voie d'administration permettant d'induire simplement et aisément une immunité locale au niveau de la région muqueuse recto-génito-urinaire chez les hotes suivants : mammifères, en particulier l'homme, et les oiseaux.

30 Un objectif particulier de l'invention est de proposer une telle voie d'immunisation pour développer une immunité locale contre le virus du SIDA (HIV).

Un autre objectif de l'invention est d'induire simultanément une immunité systémique.

Un autre objectif encore de l'invention est de proposer un mode d'immunisation qui pourra être très avantageusement combiné à une immunisation classique pour la compléter et de manière générale à tout autre type d'immunisation, locale ou systémique.

La présente invention a ainsi pour objet le développement d'une réponse locale au niveau de la muqueuse recto-génito-urinaire et des ganglions qui la drainent par injection parentérale d'une composition immunogène dans la cuisse. L'administration parentérale dans la cuisse et dans les régions avoisinantes supérieures, en particulier l'aîne, permet de cibler les ganglions iliaques et inguinaux. On préfère la voie intramusculaire dans l'un ou les deux membres inférieurs, en particulier dans le quadriceps, notamment dans le muscle droit antérieur. Une telle voie d'immunisation s'avère capable d'induire localement au niveau de cette muqueuse d'une part la production d'immunoglobulines dans les sécrétions et, d'autre part régionalement, au niveau des ganglions drainant cette muqueuse, la production de cellules B sécrétrices d'anticorps, tout en induisant une immunité systémique. Cette immunité est susceptible d'induire une protection contre l'entrée et la dissémination du pathogène considéré depuis cette région muqueuse recto-génito-urinaire.

L'invention s'applique aussi bien au domaine de la prophylaxie (e.g. vaccins) qu'au domaine de l'immunothérapie active. Le terme composition immunogène recouvre donc les compositions à visée prophylactique, en particulier vaccins, et les compositions à visée curative dans lesquelles l'immunogène est de type antigène.

Un premier objet de l'invention est donc l'utilisation d'immunogène spécifique d'un agent pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse recto-génito-urinaire, pour la production d'une composition immunogène destinée à être administrée à l'hôte par voie parentérale dans la cuisse, de préférence par voie intramusculaire, notamment dans le quadriceps, en particulier dans le muscle droit antérieur (l'administration parentérale dans un muscle de la cuisse se fera de préférence dans le muscle de chaque membre inférieur droit et gauche), de manière

à développer une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG au niveau respectivement d'une part des muqueuses recto-génito-urinaires et de leurs sécrétions, et d'autre part des ganglions qui drainent cette muqueuse, en particulier ganglions iliaques externes et internes et ganglions inguinaux. L'injection parentérale et notamment intramusculaire dans la cuisse s'avère en effet permettre le recrutement des cellules B productrices d'anticorps IgG dans les ganglions drainant la région muqueuse recto-génito-urinaire.

Il ne peut pas être exclu non plus la production d'anticorps IgA et le recrutement local des cellules B sécrétrices d'IgA comme on l'a constaté dans l'essai rapporté au point III des exemples.

La présente demande a donc aussi pour objet une telle utilisation conduisant à développer en outre une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B productrices d'IgA.

Parmi les agents pathogènes auxquels l'invention peut s'appliquer, on citera tout particulièrement :

- le virus HIV,
- les virus Herpes, e.g. Herpes simplex, notamment de type 2
- les Candida
- les Chlamydia
- le Papillomavirus humain
- les Mycoplasmes génitaux
- Treponema pallidum
- les Papovavirus, e.g. Condyloma acuminatum
- les infections à gonocoques.

Il convient de noter que ce mode d'administration ne se limite pas à induire une réponse locale, et peut permettre également d'induire en même temps une réponse systémique, les deux actions se combinant, et se complétant, voire se renforçant, de manière particulièrement avantageuse.

En conséquence, l'utilisation conforme à l'invention vise aussi à développer en plus d'une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG et éventuellement en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA, une réponse

systémique de type IgG et éventuellement IgA (anticorps et cellules B sécrétrices).

Sans qu'il soit besoin de le préciser à chaque fois, il va de soi que lorsqu'on parle d'une réponse en IgG ou IgA, anticorps et cellules B sécrétrices, il s'agit d'une réponse spécifique à l'immunogène utilisé. Pour d'autres immunogènes, la réponse
5 pourra être en plus ou à la place une réponse immunitaire cellulaire locale (lymphocytes T cytotoxiques, réponse TH1 et TH2, éventuellement supresseur).

Un autre objet de l'invention est la méthode d'immunisation contre des agents pathogènes tels que décrits plus haut, consistant à administrer par tout moyen connu en soi, la composition immunogène appropriée par voie parentérale,
10 notamment intramusculaire, dans la cuisse, de l'un ou des deux membres inférieurs, de préférence quadriceps, en particulier muscle droit antérieur. Sans qu'il soit besoin de le rappeler à chaque fois, la méthode d'immunisation peut reprendre chacune des caractéristiques, seules ou en combinaison, énoncées ici dans le cadre de l'utilisation.

15 Dans le cadre de l'utilisation et de la méthode d'immunisation, on peut préciser encore que l'invention s'applique à tous les types de composition immunogène et notamment vaccins connus, qu'ils soient de type classique ou de type recombinant. Comme cela est connu en soi, les compositions, e.g. vaccins de type classique regroupent les compositions, e.g. vaccins entiers vivants atténués ou
20 inactivés, les sous-unités (protéines ou peptides). Ils peuvent être adjuvés ou non adjuvés et être présentés sous forme combinés regroupant différentes valences et/ou différentes formes immunogènes d'une même valence. Les compositions, e.g. vaccins recombinants regroupent les vecteurs vivants exprimant un ou plusieurs immunogènes du pathogène considéré ainsi que les vecteurs plasmidiques polynucléotidiques constitués d'un ADN qui peut être par exemple nu ou inclus dans
25 un liposome (voir e.g. WO-A-90 11092, WO-A-93 19813, WO-A-94 21797, WO-A-95 20660) et qui expriment un ou plusieurs immunogènes. Pour ce qui est des vecteurs vivants recombinants, on peut citer en particulier comme vecteurs les poxvirus, tels que le virus de la vaccine et surtout les poxvirus aviaires (canarypox, fowlpox, pigeonpox, etc.), tels que ceux décrits dans Tartaglia et al., Virol. 1992, 188 : 217,
30 ainsi que les adénovirus. S'agissant d'une nouvelle voie d'administration, il est bien

évident que l'invention ne peut pas être limitée à un type particulier de composition, e.g. vaccins mais a vocation à s'appliquer à tous les types de compositions immunogènes, e.g. vaccins, et à toutes les compositions, e.g. vaccins, disponibles utilisables par voie parentérale, notamment intramusculaire.

5 De même, le protocole d'immunisation sera fonction du type de composition ou de la composition utilisée. Il inclura le nombre d'administrations habituellement utilisé pour une composition donnée ce qui, de manière générale, correspondra à plus d'1 administration, notamment de 2 à 4. L'homme du métier est de toute façon parfaitement à même par des essais de routine de déterminer le nombre optimum
10 d'administrations (e.g. primo-vaccination et rappel).

Cette immunisation ciblée pourra aussi être associée à une immunisation systémique classique par la même composition ou une autre composition contre le même pathogène.

On peut aussi lui associer chez le même hôte un protocole d'immunisation
15 ciblant la muqueuse buccale comportant l'administration d'une composition immunogène contre le même pathogène, identique ou différente, notamment de la même composition, visant à induire une réponse locale en IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG et éventuellement en IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA au niveau respectivement de la salive et des ganglions drainant la muqueuse buccale,
20 notamment des ganglions sous-maxillaires (elle peut aussi s'accompagner d'une réaction systémique), de préférence par injection sublinguale dans le plancher de la bouche. L'essai rapporté aux points III et IV montre qu'une injection sublinguale est un moyen approprié. On peut bien entendu utiliser d'autres moyens aptes à activer convenablement les ganglions drainant la muqueuse buccale, notamment les
25 ganglions sous-maxillaires.

Une telle combinaison est particulièrement utile pour prévenir ou traiter une infection par un pathogène ayant à la fois les portes d'entrée buccale et recto-génito-urinaire. On peut citer notamment le virus HIV, Herpèsvirus, etc.

En conséquence, selon un développement avantageux de la présente
30 invention, l'utilisation d'immunogène spécifique d'un pathogène donné vise la production d'une part d'une composition immunogène destinée à être administrée à

un hôte par voie parentérale dans la cuisse, notamment par voie intramusculaire dans la cuisse, de préférence dans le quadriceps, en particulier dans le muscle droit antérieur, de manière à induire une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG, éventuellement en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA, au niveau des muqueuses recto-génito-urinaires (pour les anticorps) et dans les ganglions qui les drainent (pour les cellules sécrétrices), comme décrit plus haut, et d'autre part une composition immunogène, identique ou différente de la précédente, destinée à être administrée au même hôte de manière à induire de façon similaire une réponse de type IgG, éventuellement de type IgA, au niveau de la muqueuse buccale, et des ganglions qui la drainent, en particulier ganglions sous-maxillaires, et de préférence par injection sublinguale dans le plancher de la bouche.

La méthode d'immunisation correspondante prévoit donc cette double administration.

Cette immunisation ciblant la muqueuse buccale s'accompagne aussi d'une immunisation systémique qui se combine avantageusement à celle résultant de l'immunisation ciblant les muqueuses recto-génito-urinaires.

On peut aussi combiner ces deux immunisations locales à une immunisation systémique classique, en utilisant une même composition ou des compositions différentes dirigées contre le même pathogène.

L'utilisation et la méthode d'immunisation conformes à l'invention trouvent une application préférée dans le cadre de la vaccination contre le virus HIV.

Un exemple particulier est l'utilisation d'un vaccin regroupant un vecteur exprimant gp120/gp160 de HIV et de la sous-unité glycoprotéique gp120/gp160 de ce même virus. Un exemple particulier est décrit plus loin.

Dans le cadre de la présente invention, on prévoit ainsi de mettre en œuvre ce vaccin anti-HIV pour son administration par voie intramusculaire dans la cuisse, éventuellement combiné à une administration sublinguale et/ou systémique classique, e.g. par injection intramusculaire dans le deltoïde.

Enfin, l'invention a encore pour objet une composition immunogène comprenant au moins un immunogène spécifique d'un pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse recto-génito-urinaire et un véhicule ou

excipient pharmaceutiquement acceptable, ce véhicule ou excipient, ou cette composition, conduisant, en liaison avec l'immunogène, à une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG au niveau de cette région muqueuse, lorsque la composition est administrée par voie parentérale dans la cuisse, notamment par voie intramusculaire. Dans le cadre de cette composition immunogène, les caractéristiques énoncées ici au regard des autres objets de l'invention, peuvent être reprises seules ou en combinaison.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide de modes de réalisation pris à titre d'exemples non limitatifs :

EXEMPLES

I - Ciblage des ganglions

Le ciblage des ganglions impliqués dans les réponses recto-génito-urinaires par la voie intramusculaire dans la cuisse est illustrée par des expériences effectuées chez le macaque cynomolgus : dans ces expériences, une solution de colorant Bleu d'Evans à 2 % en solution saline a été injectée (0,5 à 1 ml) dans le muscle droit antérieur au niveau d'un site situé à distance d'un tiers de l'aîne et de deux tiers du genou.

La dissection des animaux euthanasiés 4 heures après injection du colorant, a permis le repérage des ganglions drainant la zone d'inoculation grâce à leur coloration bleue : ganglions inguinaux et iliaques ont ainsi été identifiés.

II - Vaccin

II-1 - vaccin vivant recombinant vCP205, ALVAC-HIV :

vCP205 est un virus canarypox ALVAC dont la construction est décrite à l'exemple 14 de WO-A-95 27507 auquel l'homme du métier pourra se reporter. Il est capable d'exprimer les gènes *env*, *gag* et *pro* du virus HIV-1. Ces gènes sont insérés dans le locus C3 et sont régulés par les promoteurs H6 et I3L du virus de la vaccine.

Un plasmide pHIV32 contenant les cassettes d'expression pour le gène de la glycoprotéine *env* gp120 MN (plus la partie transmembranaire de gp41 LAI) et les gènes de la souche LAI codant pour *gag* et pour la protéase *pro*, a été utilisé comme plasmide donneur dans une procédure de recombinaison *in vivo* pour produire le

vCP205. Ces cassettes ont été insérées dans le locus C3, entre les séquences flanquantes d'ALVAC, dans une configuration 5'-5', et liées aux promoteurs H6 et I3L.

Le vCP205 a été produit sur fibroblastes d'embryons de poulets en milieu DMEM-Ham F12 sans sérum, additionné de lactoglutamate et clarifié par centrifugation. Le titre moyen était de $10^{8.0}$ DICC₅₀/ml sur cellules QT35. On prépare les solutions vaccinales par dilution en PBS ("phosphate buffer saline") avec Ca⁺⁺ et Mg⁺⁺.

II-2- vaccin de sous-unité gp160MN/LAI-2

La sous-unité produite est une sous-unité gp160 hybride obtenue à partir d'un vecteur pox.

On utilise un vecteur vaccine VWTG9150 pour produire la gp160. Ce vecteur code pour une gp160 soluble hybride dans laquelle la partie gp120 est dérivée de la souche HIV-1 MN et la partie gp41 provient de l'isolat LAI. Les séquences d'ADN correspondantes ont été fusionnées à l'aide d'un site de restriction artificiel SmaI ne modifiant aucune des deux séquences d'acide aminés de gp120 et gp41. On décrit ci-après brièvement la construction.

La séquence codant pour gp120 MN a été amplifiée à partir de cellules SupT1 infectées par HIV-MN, par technique PCR avec des oligonucléotides introduisant un site de restriction SphI et un site SmaI respectivement immédiatement en aval de la séquence codant pour la peptide leader et en amont des sites de clivage situés entre gp120 et gp41.

La séquence codant pour gp41 a été ainsi produite : la séquence codante complète de env HIV-1 LAI a été placée sous le contrôle du promoteur PH5R du virus de la vaccine. Plusieurs modifications ont été apportées. Un site de restriction SphI a été créé immédiatement en aval de la séquence codant pour le peptide leader, sans altérer la séquence en acides aminés. On a aussi créé un site de restriction SmaI immédiatement en amont de la séquence codant pour les sites de clivage entre gp120 et gp41, sans altérer la séquence en acides aminés. Les deux sites de clivage en position 507-516 (numérotation des acides aminés selon Myers et al. dans : Human retroviruses and AIDS (1994) Los Alamos National

Lab. (USA)) ont été mutés (séquence originale : KRR ... REKR mutée en QNH ... QEHN). La séquence codant pour le peptide hydrophobe transmembranaire IFIMIVGGLVGLRIVFAVLSIV (acides aminés 689-710 d'après Myers et al. supra) a été délétée. Un codon stop a été introduit à la place du deuxième codon E de la

5 séquence codant pour PEGIEE (acides aminés 735-740 d'après Myers et al.), c'est-à-dire le 29^{ème} acide aminé du domaine intracytoplasmique.

Le plasmide dans lequel la séquence LAI était insérée entre les régions homologues du gène TK du virus de la vaccine, a été coupé par SphI et SmaI, puis lié à la séquence gp120 MN. Le VVTG9150 a ensuite été construit par

10 recombinaison homologue conventionnelle et propagé pour assurer l'expression de la gp160 selon la méthode habituellement utilisée pour vCP205 sur cellules BHK21. Le gp160 a ensuite été purifiée par chromatographie d'immunoaffinité.

III Essais 1

Deux macaques rhésus femelles (P9224 et P9225) déjà immunisées par voie

15 intramusculaire (dans les cuisses gauche ou droite, alternativement) 2 fois avec $10^{6.5}$ DICC₅₀ de l'ALVAC-HIV (vCP205) clarifié, puis 3 fois avec 100 µg de gp160 MN/LAI-2 adjuvée avec de l'OspA ("outer surface protein A" de *Borrelia burgdorferi*) et de l'hydroxyde d'alumine, ont été inoculées 2 fois à 1 mois d'intervalle, dans le plancher de la bouche (sublinguale), avec un mélange contenant de 10^6 DICC₅₀ de vCP205

20 clarifié et 100 µg de gp160 MN/LAI-2. La salive, l'urine, les sécrétions vaginales et rectales ainsi que le sérum ont été analysés par ELISA pour détecter la présence d'IgA et d'IgG anti-gp160 et anti-CPpp (contre le virus canarypox lui-même).

L'un des deux singes (P9225) a reçu une injection supplémentaire du même mélange (vCP205 + gp160 MN/LAI-2) dans le plancher de la bouche ainsi que le

25 haut de la cuisse droite, trois mois après la dernière injection. Les lymphocytes du sang périphérique et de certains ganglions lymphatiques (sous-maxillaires, axillaires, inguinaux et iliaques) ont été analysés en ELISPOT pour la détection de cellules B productrices d'anticorps IgA et IgG spécifiques de gp160 et CPpp.

Il a pu être montré l'apparition d'IgA anti-gp160 et anti-CPpp dans le lavage

30 de bouche du macaque P9224. Les réponses IgG spécifiques anti-gp160 sont apparues dès la première injection dans la plupart des sécrétions testées et se sont

maintenues tout au long de l'étude.

Par ailleurs, les sérums des deux macaques ont montré une augmentation significative des IgA et IgG spécifiques de gp160 et CPpp.

Enfin, il a été mis en évidence par ELISPOT, chez le singe P9225, une induction préférentielle de cellules B sécrétrices d'anticorps IgA⁺ et IgG⁺ anti-gp160 et anti-CPpp dans les ganglions lymphatiques ciblés par les immunisations, à savoir les ganglions sous-maxillaires et inguinaux droits. Ces cellules étaient présentes également dans le sang périphérique, mais à plus faible fréquence.

Pour conclure, ce test a montré la possibilité d'induire une réponse anticorps locale et systémique anti-HIV-1 chez le singe rhésus après immunisation à proximité de ganglions drainant les muqueuses buccales et recto-génito-urinaires.

IV Essais 2

Le vaccin est un mélange contenant $10^{6,3}$ DICC₅₀ de vCP205 et 100 µg de sous-unité gp160.

On a aussi utilisé un vecteur ALVAC ne comprenant aucune séquence HIV, comme témoin.

- Groupe 1 :

4 singes (macaques rhésus) ont reçu à 4 reprises, à 1 mois d'intervalle, une injection du mélange vaccinal par voie sublinguale dans le plancher de la bouche ; mélange à volume égal de vCP205 à $10^{6,9}$ DICC₅₀/ml et de gp160 à 400 µg/ml ; 0,25 ml à droite et 0,25 ml à gauche.

- Groupe 2 :

4 singes (macaques rhésus) ont reçu à 4 reprises, à 1 mois d'intervalle, une injection du mélange vaccinal par voie intramusculaire dans la cuisse (perpendiculaire au, et dans le muscle droit antérieur) ;

mélange à volume égal de vCP205 à $10^{6,6}$ DICC₅₀/ml et de gp160 à 200 µg/ml ; 0,5 ml à droite et 0,5 ml à gauche.

- Groupe 3 (témoins) :

3 singes (macaques rhésus) ont reçu à 4 reprises, à 1 mois d'intervalle, une injection du vecteur ALVAC par voie intramusculaire dans la cuisse ;

ALVAC (CPpp) à $10^{6,3}$ DICC₅₀/ml ; 0,5 ml à droite et 0,5 ml à gauche.

On a mesuré le nombre de lymphocytes B sécréteurs d'IgG⁺ totales, spécifiques de la gp160 (résultant des deux types de vaccins) et spécifiques du vecteur ALVAC témoin pour 10⁶ cellules mononuclées, par prélèvement et dans chaque groupe de macaques. La moyenne et l'écart-type calculés ont été arrondis à l'unité la plus proche.

Les ganglions droits et gauches de chaque catégorie (sous-maxillaires, axillaires, inguinaux, iliaques internes, iliaques externes) ont été prélevés après sacrifice de l'animal, broyés (les ganglions sous-maxillaires droits et gauches ont été poolés), puis soumis à l'analyse des cellules productrices d'anticorps par la technique ELISPOT (adaptée de Erikson K. et al. , Journal of Immunological methods, 153 : 107-113, 1992).

Une réponse systémique en anticorps IgG a aussi été constatée.

Les résultats de comptage des lymphocytes B sécréteurs d'IgG du comptage des lymphocytes B producteurs d'IgG sont rassemblés dans le tableau qui suit :

| Lymphocytes B IgG+ pour 10 ⁶ cellules mononucléées | | | | | |
|---|---|--|----------|---------|---------|
| Groupe (nb de singes/groupe) | Immunsation : Voie Immunogène | Prélèvement (sacrifice à S14, après 4 injections) | Totales | gp160 | CPpp |
| 1 (n = 4) | Injection sublinguale ALVAC-HIV (vCP205) + gp160 MN/LAI-2 | Sang | 167±48 | 1±0 | 1±1 |
| | | Ganglions sous-maxillaires | 1168±271 | 190±127 | 141±63 |
| | | Ganglions axillaires | 430±311 | 0±0 | 2±2 |
| | | Ganglions iliaques internes | 662±345 | 2±1 | 2±1 |
| | | Ganglions iliaques externes | 996±508 | 1±1 | 3±3 |
| | | Ganglions inguinaux | 320±83 | 1±1 | 2±1 |
| 2 (n = 4) | Injection IM (cuisse) ALVAC-HIV (vCP205) + gp160 MN/LAI-2 | Sang | 152±40 | 1±0 | 2±0 |
| | | Ganglions sous-maxillaires | 575±156 | 2±1 | 2±1 |
| | | Ganglions axillaires | 1251±393 | 2±0 | 2±1 |
| | | Ganglions iliaques internes | 657±188 | 9±4 | 4±6 |
| | | Ganglions iliaques externes | 752±179 | 277±146 | 226±175 |
| | | Ganglions inguinaux | 817±199 | 62±88 | 11±13 |
| 3 (n = 3) | Injection IM (cuisse) Vecteur ALVAC (CPpp) | Sang | 173±46 | 0±0 | 3±1 |
| | | Ganglions sous-maxillaires | 540±148 | 0±0 | 1±1 |
| | | Ganglions axillaires | 624±132 | 0±0 | 1±0 |
| | | Ganglions iliaques internes | 612±67 | 0±0 | 4±4 |
| | | Ganglions iliaques externes | 700±162 | 0±0 | 248±202 |
| | | Ganglions inguinaux | 531±83 | 0±0 | 210±80 |

Il doit être bien compris que l'invention définie par les revendications annexées n'est pas limitée aux modes de réalisation particuliers indiqués dans la description ci-dessus, mais en englobe les variantes qui ne sortent ni du cadre ni de l'esprit de la présente invention.

REVENDICATIONS

1. Utilisation d'immunogène spécifique d'un agent pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse recto-génito-urinaire, pour la production d'une composition immunogène destinée à être administrée par voie parentérale dans la cuisse, de manière à développer une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG au niveau respectivement des muqueuses recto-génito-urinaires et des ganglions qui les drainent.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à être administrée par voie intramusculaire dans la cuisse.

3. Utilisation selon la revendication 2, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à être administrée dans le/les quadriceps, notamment le/les muscles droits antérieurs.

4. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à développer aussi une réponse systémique.

5. Utilisation selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la composition immunogène est destinée à développer aussi une réponse locale en anticorps IgA et en cellules B sécrétrices d'IgA.

6. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 4, caractérisée en ce que la composition immunogène est dirigée contre un pathogène choisi dans le groupe consistant en :

- le virus HIV,
- les virus Herpès, e.g. Herpes simplex
- les Candida
- les Chlamydia
- le Papillomavirus humain

- les Mycoplasmes génitaux
- Treponema pallidum
- les infections à gonocoques.

7. Utilisation d'immunogène spécifique d'un agent pathogène ayant une porte d'entrée au niveau de la région muqueuse recto-génito-urinaire et de la région buccale, pour la production d'une composition immunogène destinée à être administrée chez un hôte par voie parentérale dans la cuisse, de manière à induire une réponse locale en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG, au niveau des muqueuses recto-génito-urinaires et des ganglions qui les drainent, et d'autre part d'une composition immunogène, identique ou différente de la précédente, destinée à être administrée au même hôte de manière à induire une réponse en anticorps IgG et en cellules B sécrétrices d'IgG, au niveau de la muqueuse buccale et des ganglions qui la drainent, de préférence par injection sublinguale dans le plancher de la bouche.

8. Utilisation selon la revendication 7, caractérisée en ce que la composition immunogène administrable dans la cuisse est destinée à être administrée par voie intramusculaire.

9. Utilisation selon la revendication 8, caractérisée en ce que la composition immunogène administrable dans la cuisse est destinée à être administrée dans le/les quadriceps, de préférence dans le/les muscles droits antérieurs.

